

広島大学学位請求論文

**TALEN を用いた *Rhizopus* 属糸状菌に  
おける高効率遺伝子組換え技術の開発**

(Development of gene manipulation in the  
Mucorales fungus *Rhizopus* using TALENs)

(要約)

2022年

広島大学大学院 統合生命科学研究科  
数理生命科学プログラム

壺井 雄一

## 目次

### 概要

第1章 *Rhizopus* 属菌における TALEN の機能性の検証と遺伝子破壊技術の構築

第2章 *Rhizopus* 属菌における TALEN を用いた **homology-directed repair** を介した組換え技術の構築

### 総括

## 概要

*Rhizopus*属糸状菌は、発酵生産に利用される有用な側面を持つ一方、病害菌としての側面ももつ二面性がある微生物として知られている。それゆえ*Rhizopus*属菌の遺伝的改変技術は重要であるが、ターゲティングしてのゲノム改変は極めて困難であることが報告されていた。そこで第1章では、*Rhizopus*属菌において人工DNA切断酵素の一つであるTALENの機能性について検証し、欠失・挿入 (Indel) 変異による遺伝子破壊について検討した。第2章では、TALENを用いて Homology-directed repair (HDR: 相同配列依存的修復) を介した遺伝子改変技術の構築を目指した。

## 第1章 *Rhizopus*属菌におけるTALENの機能性の検証と遺伝子破壊技術の構築

### 緒言

*Rhizopus*属糸状菌では非相同組換えでのゲノムへのDNA導入技術は確立されつつあるが、ターゲティングしての遺伝子改変は未だ困難であるのが現状である。そのため、宿主の相同組換え効率に依存しない新しい技術開発が求められていた。そこで本章では、遺伝子ターゲティングを介した遺伝子破壊技術を構築することを目的とし、TALENを用いて検討を行った。

### 実験材料と方法

#### 宿主ベクター系の開発

*Rhizopus oryzae* NBRC5384株を用い、本菌で機能する宿主ベクター系の開発を行った。本菌に対して変異原として紫外線を照射し、アデニン要求性株を取得した。また変異遺伝子として*adeA*を同定し、*adeA*を遺伝子マーカーとした宿主ベクター系を開発した。さらにRNA-seq解析により、既報の*pdca*プロモーターより強発現のプロモーターとして、*ldhA*プロモーターと*adh*プロモーターを同定した。

また誘導プロモーターとして、報告がある*amyA*プロモーターを選択した。

### ***R. oryzae* 用 TALEN destination ベクターの構築**

*R. oryzae* 用 TALEN destination ベクターの構築のため、Platinum TALEN scaffold を *R. oryzae* 用ベクターにクローニングした。また *R. oryzae* の *trpC* 遺伝子に対する TALEN 標的サイトとして、*trpC-1* 及び *trpC-2* の 2 箇所設計した。設計には TALEN Targeter を用いた。

### ***R. oryzae* 由来新規エキソヌクレアーゼのクローニング**

*Rhizopus* 属菌由来のエキソヌクレアーゼは報告がないため、ゲノム解析結果を用い、*RokemI* と *RoxrnI* を抽出した。それぞれ Accession No.として、Accession No. LC638492 及び Accession No. LC638493 を取得した。

### **5-フルオロアントラニル酸耐性の菌株の選抜とトリプトファン要求性株の同定**

TALEN プラスミドを形質転換した胞子を用い、生育後の胞子形成により遺伝的な分離を行った後、変異胞子を 2-amino-5-fluorobenzoic acid 培地 (以下、5-FAA 培地) にて選抜を行った。また生育した菌体のトリプトファン要求性を確認するため、トリプトファンを含むまたは含まない培地にて生育を確認した。

### ***trpC* 遺伝子領域の変異解析**

遺伝子型解析のため、TALEN の標的部位付近のシーケンスを行った。

## **結果と考察**

### **TALEN を用いた標的遺伝子破壊の検討**

*R. oryzae* において TALEN の遺伝子破壊効率を評価するため、*trpC* 遺伝子を標的とした。本遺伝子の破壊株は 5-FAA を用いることでポジティブセレクションできることが報告されている。上述 3 種のプロモーターを連結した TALEN プラスミドを用いてそれぞれ形質転換を行い、5-FAA 培地によるスクリーニングを行った結果、耐性株を得ることができるものの、全てトリプトファン要求性株でないことがわかった。この結果から、*R. oryzae* では TALEN のみの使用によって効率的に遺伝子破壊を行うことは困難であることが示された。

### ***R. oryzae*におけるエキソヌクレアーゼのオルソログの同定**

ラット受精卵での検討にて、エキソヌクレアーゼ 1の強発現によりTALENを用いた遺伝子破壊効率が向上することが示されていたことから、*R. oryzae*のエキソヌクレアーゼのオルソログを探索した。典型的なエキソヌクレアーゼのオルソログは発見できなかったが、エキソヌクレアーゼ活性をもつことが報告されている多機能なエキソリボヌクレアーゼのオルソログとして、RoKem1とRoXrn1を同定した。

### TALENとエキソヌクレアーゼの共発現による標的遺伝子の破壊検討

TALENペアと新規エキソヌクレアーゼのプラスミドを共導入し、形質転換体を5-FAA培地にて選抜した。依然として多くの5-FAA耐性株が得られたものの、5株のトリプトファン要求性株を取得した。上述の5株のトリプトファン要求性株に対して、*trpC*遺伝子領域のシーケンス解析を行った結果、切断末端からの塩基欠失を確認した。また取得された変異体は、238 bpが欠失したものが1株と709 bp欠失したものの4株であった。以上から、本結果はTALENによる切断とエキソヌクレアーゼによる削り込みによって、中規模の塩基欠失が誘導されたと考えられた。また切断末端の詳細な解析から、通常糸状菌では多くの真核生物と同様にDSBの修復経路としてはnon-homologous end-joining (NHEJ) が優位であるが、本菌においてはmicrohomology-mediated end-joining (MMEJ) が優位である可能性が示唆された。

## 第2章 *Rhizopus*属菌におけるTALENを用いたhomology-directed repairを介した組換え技術の構築

### 緒言

*Rhizopus*属糸状菌においては相同組換え体の取得が極めて困難であることが知られており、その課題は大きく2点ある。1点目は、そもそもの相同組換え効率が極めて低い点である。そして2点目は、本菌は線状DNAが環状化し複製起点がなくとも複製され細胞内で保持される点である。このため本菌では相同組換え体の取得が極めて困難であり、先行研究でも1例しか報告がない。第1章にてエキ

ソヌクレアーゼと共発現することにより、TALENが機能することが確認された。本章では、線状DNAの環状化を抑制するため一本鎖DNAを用いたターゲティングによる遺伝子改変技術の構築を目的とし、TALEN発現ベクターと一本鎖DNA供与体を用いた改変効率の検討を行った。

## 実験材料と方法

### 宿主ベクター系の開発

*Rhizopus delemar* JCM5557株を用い、本菌で機能する宿主ベクター系の開発を行った。本菌に対して変異原としてイオンビームを照射し、トリプトファン要求性株を取得した。また変異遺伝子として*trpC*を同定し、*trpC*を遺伝子マーカーとした宿主ベクター系を開発した。さらにゲノム解読を行い、*adh*プロモーターと*cipC*プロモーターを取得した。

### *pdcl* 及び *pd3* 遺伝子座を標的とする TALEN 発現ベクターの作製

Transposagen Biopharmaceuticals 社に依頼し、*R. delemar* の *pdcl* 遺伝子座を標的とする TALEN を作製した。また *R. delemar* の *pd3* 遺伝子座及び *R. oryzae* の *ldhA* 遺伝子座を標的とする TALEN は、Life technologies に依頼し作製した。

### エキソヌクレアーゼ発現ベクターの構築

エキソヌクレアーゼは第1章にて単離した RoKem1 を用いた。

### HDR 用 DNA 断片を作製するためのプラスミドの構築

*R. delemar* の *pdcl* 遺伝子座及び *pd3* 遺伝子座において、HDR により *pdcl* 遺伝子の ORF を除去し、遺伝子導入マーカーである *trpC* 遺伝子領域を挿入するため、HDR 用の DNA 断片の作製に用いるプラスミドを作製した。

同様に *R. oryzae* の *ldhA* 遺伝子座において、HDR により *ldhA* 遺伝子 ORF と *adeA* 遺伝子領域を入れ替えるためのプラスミドを構築した。

### HDR 用二本鎖 DNA 断片及び一本鎖 DNA 断片の調製

HDR 用の DNA 断片は、上述のプラスミドを用い、PCR により調製した。また一本鎖 DNA 断片の調製は、上記 DNA 溶液を Lambda Exonuclease を用いて処理することで得た。

## HDR 株の選抜

形質転換した胞子を用い、生育後の胞子形成により遺伝的な分離を行った後、ゲノム改変の確認はコロニーPCR用により行った。

## 結果と考察

### *R. delemar*の*pdcl*遺伝子領域における二本鎖DNAと一本鎖DNAを用いた場合のHDR効率の比較

相同部分を*pdcl*遺伝子の開始コドンの5'側及び終止コドンの3'側の1000 bpとした二本鎖DNA断片および1000 baseとした一本鎖DNA断片を調製し、各条件にて形質転換を行った。二本鎖DNAのみを用いた条件では、生育した108株のうち、HDR株は存在しなかった。一方、一本鎖DNAのみを用いた条件では、選抜により生育した株が得られなかった。続いて、TALENとエキソヌクレアーゼの共発現下での検討を行った。二本鎖DNAを用いた場合では、生育した108株中にHDR株は存在しなかったが、一本鎖DNAを用いた場合には、生育した株のうち1株がHDR株 (HDR効率 12.5%) であることを確認した。以上から、本菌においてHDRを介した効率的な遺伝子改変手法の確立に成功した。

続いて一本鎖DNAでのHDRに必要な相同部分の配列長について検討を行った。相同配列長100 baseにおいては選抜株24株中のうち22株がHDR株であり、また50 baseにおいては選抜株24株のうち19株がHDR株であった (HDR効率 19%)

### *R. delemar*の*pdcl*遺伝子領域における一本鎖DNAでのHDR検討

HDRに供する一本鎖DNA断片の相同配列長は*pdcl*遺伝子の5'側を1000 base、3'側を950 baseとした。生育した20株のうち、8株がHDR株であることを確認した (HDR効率 40%)。以上から他の遺伝子領域でも本法が機能することを確認した。

### *R. oryzae*の*ldhA*遺伝子領域における一本鎖DNAでのHDR検討

*Rhizopus oryzae*にて標的部位を*ldhA*遺伝子領域とし、TALEN、エキソヌクレアーゼ及びHDRを誘導する鋳型として二本鎖DNA断片または一本鎖DNA断片を用い、検討した。HDRに供する二本鎖DNAまたは一本鎖DNA断片の相同配列長は、*ldhA*遺伝子の5'側及び3'側のそれぞれ1000 bp (or base) とした。その結果、二

本鎖DNAを用いた場合、選抜により生育した24株のうち、HDR株は得られなかったが (HDR効率 0%)、一本鎖DNAを用いた場合は、選抜により生育した24株のうち、HDR株は18株であった (HDR効率 75%)。本法にて*R. oryzae*でも同様にHDRによりゲノム改変が可能であることを確認し、*Rhizopus*属菌において本法が汎用性高く使用できることを確認した。

## 総括

第1章において、エキソヌクレアーゼと共発現することで、*Rhizopus* 属菌にてTALEN が機能し、ゲノム編集として Indel 変異の導入が可能であることを初めて報告した。続く第2章では、その技術をさらに発展させHDR による組換え技術の構築に成功した。また本法が *Rhizopus* 属菌の2種で機能することを確認し、*Rhizopus* 属菌にて広く汎用的に適用できることを確認した。

本研究で開発した遺伝子改変手法は、*Rhizopus* 属菌において、基礎科学的知見の蓄積に貢献でき、また代謝工学の進展に大きく寄与すると考えられる。さらに、持続可能な世界の実現のため、SDGs の推進に貢献できると考えられる。